Ueber die pflanzliche Organkultur und ihre Anwendung bei physiologischen Untersuchungen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel

von

Ernst Burlet

aus Reichenburg (Kanton Schwyz)

Bern / Buchdruckerei Büchler & Co. / 1940

Genehmigt von der philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
auf Antrag der Herren Professoren

Dr. G. Senn und Dr. M. Geiger-Huber.

Basel, den 27 Juni 1939.

Der Dekan: Prof. Dr. P. Ruggli.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Separatabdruck aus: „Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft"
1940, Band 50
(Als Sonderdruck ausgegeben am 25. Juli 1940)

Ueber die pflanzliche Organkultur und ihre Anwendung bei physiologischen Untersuchungen.

Von *Ernst Burlet,* Basel.

Eingegangen am 5. März 1940.

Einleitung.

Die Methode der pflanzlichen Organkultur, wie sie frühere Autoren (Kotte 1922; Robbins 1922) ausgearbeitet haben, wurde hauptsächlich zur Beantwortung morphologischer Fragen angewendet. Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand dagegen darin, eine für *quantitative stoffwechselphysiologische,* speziell hormonphysiologische Untersuchungen geeignete Methodik der keimfreien pflanzlichen Organkultur auszuarbeiten und ihre Anwendungsmöglichkeit zur Untersuchung verschiedener Probleme zu prüfen. Vor allem sollte versucht werden, die verschiedenen Teile der Pflanze *einzeln* zu kultivieren, um die oft störend wirkenden korrelativen Erscheinungen auszuschalten.

Wegleitend für die Auswahl von Material und Methode war die Notwendigkeit der *keimfreien Flüssigkeits*kultur. Die Keimfreiheit verhindert Gehaltsveränderungen der Kulturlösung an Nähr- und Wirkstoffen durch Mikroorganismen; die Flüssigkeitskultur ermöglicht eine gleichmässige Berührung des Objektes mit dem Kulturmedium sowie die quantitative Bestimmung der Wirkungen und eventuellen Veränderungen der Nährlösung.

Teilergebnisse dieser Untersuchungen wurden in den Jahren 1936 bis 1938 zum Teil als vorläufige Mitteilungen veröffentlicht und werden in der Folge nur kurz angedeutet. (Ernst Burlet 1936; M. Geiger-Huber 1936; M. Geiger-Huber und E. Burlet 1936; Ernst Burlet 1938.)

Methode der Organkultur.

Die Verwendung der pflanzlichen Organkultur als stoffwechselphysiologische Untersuchungsmethode hat zur Voraussetzung, dass zu Beginn des physiologischen Versuches dem Experimentator bestimmte Organe der aseptisch gewachsenen jungen Keimpflanze zur Verfügung stehen und dass es ihm gelingt, sie bei Abwesenheit von Mikroorganismen in vitro weiter zu kultivieren. Dies wiederum bedingt Verwendung von keimfreiem Ausgangsmaterial, aseptische Arbeitsweise, geeignete Abtrennungsmethode der Organe und schliesslich eine geeignete Kulturmethode, um die aseptisch gewonnenen Organe am Leben zu erhalten

und zu weiterem Wachstum zu bringen. Der für eine Standardmethode einzuschlagende Arbeitsgang kann etwa folgendermassen angedeutet werden :

Auswahl des Materials und Vorbereitung der Samen — Desinfektion — Quellen der Körner — Keimung — Abtrennen der zu verwendenden Organe — Organkultur — (anschliessend physiologischer Versuch).

a) Auswahl des Materials und Vorbereitung der Körner.

Als geeignetes Material wurde im Anschluss an die von Robbins (1922) gemachten Erfahrungen *Zea Mays* gewählt. Zea Mays besitzt eine günstige Korngrösse und lässt sich verhältnismässig leicht und ohne Schaden zu nehmen desinfizieren; ferner ertragen die einzelnen Teile der Keimpflanzen die Kultur in flüssigem Medium.

Anzustreben ist bei dem zur Verwendung gelangenden Material eine möglichst *gleichmässige Keimung* des Grossteils der Körner und möglichst *gleichmässiges Wachstum* der Versuchsobjekte. Da es mir nicht möglich war, eine homozygote Maissorte zu erhalten, wurden mit den gewöhnlichen Handelssorten Vorversuche angestellt; auf ihre Eignung in dieser Hinsicht wurden untersucht : Pferdezahnmais, gelber Elsässermais, Amerikanermais, Zuckermais und Rheintalermais. Die letzte Sorte kam den obgenannten Anforderungen am nächsten, jedoch liess die Gleichmässigkeit des Materials trotz Auswahl nach Einzelgewicht und äusserem Aussehen so lange zu wünschen übrig, bis es möglich war, ganze Maiskolben zu erhalten und daher für einen Versuch jeweils nur Körner des *gleichen* Kolbens zu verwenden. Nach Entfernen der extrem grossen und extrem kleinen Körner an den Kolbenenden konnte dann zuverlässig mit 30—40 *gleichzeitig* keimenden Körnern gerechnet werden. Dieses Ergebnis ist für ein gleichmässiges Wachstum beispielsweise der Wurzel von grosser Bedeutung, denn nur bei ungefähr gleicher Gesamtlänge der verschiedenen Wurzeln *vor* der Abtrennung kann später ein gleichmässiges Wachstum der abgetrennten Teile erzielt werden.

Das durchschnittliche *Lufttrockengewicht* des einzelnen Kornes war zur Zeit der Verwendung 0,3 g, sein *Wassergehalt* betrug ca. 8 %; Angaben über die Wasseraufnahme finden sich auf S. 521.

b) Desinfektion.

Als hauptsächlich infizierte Stelle des Kornes wurde der « Fruchtstiel », d. h. die Verwachsungsstelle von Korn und Kolben erkannt. Um die dort sitzenden Keime durch chemische Desinfektion unschädlich zu machen, müsste so stark desinfiziert werden, dass dadurch das normale Wachstum geschädigt wird. Frühere Autoren (Schander, 1934) haben diesen Infektionsherd durch Ausbohren mit zahnärztlichen Instrumenten

beseitigt. Dies war in meinem Falle technisch nicht möglich; es stellt ausserdem eine sehr zeitraubende Arbeit dar, wenn man bedenkt, dass für einen Durchschnittsversuch mit ca. 100 Wurzeln 400 Körner vorbereitet werden müssen. Die Anwachsstellen wurden deshalb mit gutem Erfolg über einem Mikrobrenner angebrannt, wodurch die normale Keimung in keiner Weise beeinflusst wird. Nach diesem Anbrennen erfolgt eine gründliche mechanische Reinigung; die Körner werden erst in Brunnenwasser etwa fünf Minuten lang gespült und dann in einer zylindrischen Flasche mit Seifenwasser fünf Minuten lang stark geschüttelt und gebürstet. Nach nochmaligem, eine Viertelstunde dauerndem Spülen mit Brunnenwasser werden die Körner eine Sekunde lang in siedendes Wasser gebracht; dadurch erfolgt eine möglichst gleichmässige Benetzung der ganzen Oberfläche und dementsprechend eine gleichmässige Einwirkung des Desinfektionsmittels.

Die Desinfektion wurde mit *Bromwasser* durchgeführt, das in einer Konzentration 1/500 eine halbe Stunde lang einwirkte. Vorversuche wurden ausserdem mit Wasserstoffperoxyd, Chlorkalk und « Uspulun » (Quecksilberpräparat) durchgeführt. Bromwasser, das dank seinen günstigen Eigenschaften schon von Polowzow (1901) zur Desinfektion von Samen verwendet wurde, hat sich weitaus am besten bewährt; die ständig entstehenden Bromdämpfe stellen einerseits ein sehr starkes Desinfiziens dar und können anderseits durch einen Luftstrom (siehe unten) praktisch vollständig vertrieben werden. Nach erfolgter Desinfektion werden die Körner viermal in geeigneter Weise (s. S. 523 oben) mit sterilem Wasser abgespült, um Spuren eventuell entstandener Bromverbindungen zu entfernen.

c) Das Quellen der Körner.

Um den Quellungsgrad der Maiskörner festzustellen, wurden sie alle 2—4 Stunden gewogen, nachdem vorher das anhaftende Wasser durch Zentrifugieren entfernt worden war. Wie die Kurve in Abb. 1 zeigt, ist die Wasseraufnahme bei den verwendeten Maiskörnern nach 30—40 Stunden zum grössten Teil beendet, d. h. sie beträgt in diesem Zeitpunkt etwa 80 % der maximalen Wasseraufnahme, was etwa 40 % des Lufttrockengewichtes entspricht. Die maximale Quellung wird in *stehendem* Wasser (Temperatur 16—18° C) in etwa 100 Stunden erreicht, doch keimen die Körner unter diesen Umständen nicht, selbst wenn der Versuch bis zu 200 Stunden fortgesetzt wird.

Wenn dagegen durch das die Körner enthaltende Wasser ständig ein schwacher Luftstrom perlt, so tritt nach etwa 60 Stunden *Keimung* auf, und die Wasseraufnahme des Kornes geht *ohne Unterbruch* über in die Wasseraufnahme der Keimpflanze. Dieses Verhalten kann wohl einerseits mit einer Verbesserung der Atmung durch Zufuhr von Sauer-

stoff erklärt werden, anderseits mit dem ständigen Abtransport der Atmungskohlensäure, die ja, wie Geiger (1928) feststellte, auf die Keimungsvorgänge schädlich wirken kann. Aus diesem Grunde wurde der Luftstrom, der nach erfolgter Desinfektion die letzten Reste Brom vertreiben soll, während der *ganzen* Dauer der Quellung durch das die Körner umgebende Wasser geschickt.

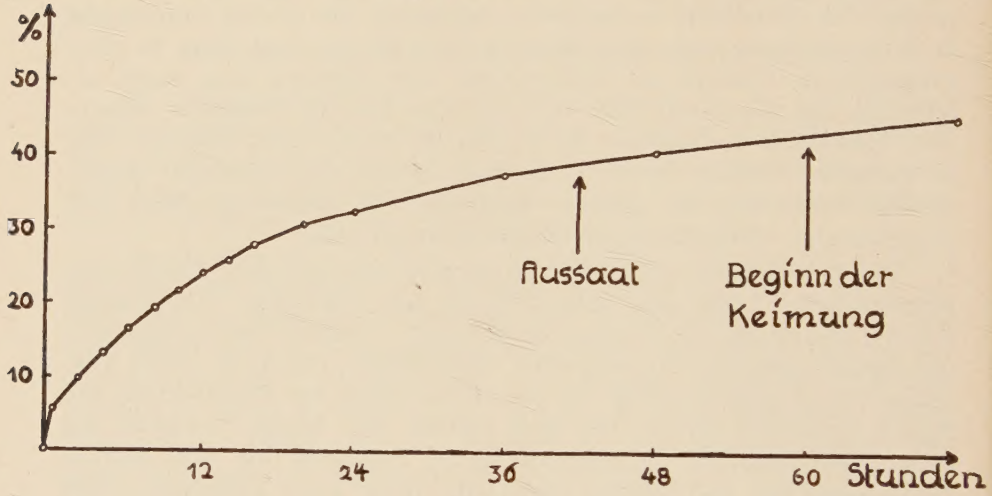

Abbildung 1.
Quellung von Maiskörnern.
Ordinate: Wasseraufnahme in % des Lufttrockengewichtes bei einer Temperatur von 16—18° C und bei ständiger Durchlüftung.
Abszisse: Zeit in Stunden.
(Diskussion der Kurve auf Seite 521.)

Die Notwendigkeit ständiger Durchlüftung führte zur Konstruktion einer in Abbildung 2 dargestellten Apparatur, welche die Durchführung von Desinfektion, Spülen und Quellen in *einem* Arbeitsgang und unter aseptischen Bedingungen gestattet. Diese Apparatur und ihre Anwendung sollen im folgenden erläutert werden, unter Angabe der aufeinanderfolgenden notwendigen Manipulationen.

Nach vorausgegangener gründlicher Reinigung wird Kolben K mit Brunnenwasser gefüllt und Quetschhahn 3 wird geschlossen; dann wird die ganze Apparatur an drei aufeinanderfolgenden Tagen im Dampftopf während einer halben Stunde desinfiziert. Bei geschlossenen Quetschhähnen 2 und 3 werden die vorbehandelten Körner (Anbrennen des Fruchtstieles, mechanische Reinigung, s. S. 521) in das Quellungsrohr Q gebracht; gleichzeitig wird Q bis zur Bedeckung aller Körner mit Bromwasser 1/500 angefüllt und mit dem Wattezapfen W 2 verschlossen. Nach einer halben Stunde wird durch Oeffnen der Quetschhähne 2 und 3 das Desinfektionsmittel abgelassen. Bei geschlossenem Quetsch-

hahn 3 und geöffneten Hähnen 1 und 2 wird durch den Luftstrom L, der in W 1 keimfrei wird, ungefähr ein Viertel des im Kolben K enthaltenen sterilen Wassers in das Quellungsrohr Q gedrückt und dann durch Schliessen von Quetschhahn 1 und Oeffnen von Quetschhahn 3 wieder abgelassen. Das Auswaschen der desinfizierten Maiskörner mit sterilem Wasser wird mindestens dreimal wiederholt. Der zur Bedeckung aller Körner notwendige letzte Rest des Wassers aus Kolben K bleibt im Rohr Q zurück, um die Quellung der Körner zu ermöglichen. Die

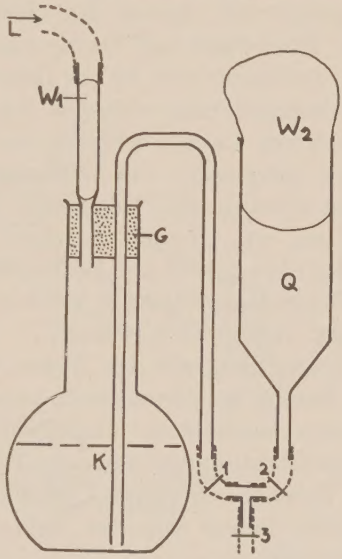

Abbildung 2.
Quellungsapparatur ca. ¼ nat. Grösse. K = Rundkolben (ca. 1000 cc); Q = Quellungsrohr; $W_1 + W_2$ = Wattefilter; L = Luftstrom; 1, 2, 3 = Quetschhähne; G = Gummistopfen; mit punktierten Linien begrenzt = Gummischläuche.

ganze Apparatur bleibt an der Wasserstrahldruckpumpe angeschlossen und wird aus früher erwähnten Gründen (s. Seite 522 oben) 30 bis 40 Stunden lang mit einem sterilen Luftstrom beschickt. Somit entsteht im Innern des Quellungsrohres Q ein schwacher Ueberdruck, welcher als zusätzliche Sicherung eine eventuelle Infektion durch das Wattefilter während der Quellungsdauer praktisch ausschliesst.

d) Keimung.

Zur Keimung werden die desinfizierten und gequollenen Maiskörner in trocken sterilisierte Deckeldosen ausgesät und mit soviel sterilisiertem Agar-Agar übergossen, dass die ganze Bodenfläche der Deckeldose mit einer ungefähr 2 mm dicken Agarschicht bedeckt ist, in welcher die Körner nach dem Erkalten festgehalten werden, so dass die Dosen je nach Bedarf aufrecht oder invers gestellt werden können. Ferner erzeugt die Agarschicht eine für die Keimung genügend feuchte Atmosphäre in den Dosen. Es ist wichtig, dass die Temperatur des flüssigen Agars knapp über dem Erstarrungspunkte liegt, denn nur dann bleiben

die Körner ungeschädigt; ausserdem wird auch die Gefahr einer Infektion durch Einströmen von keimhaltiger Luft der Atmosphäre in das Innere der erkaltenden Deckeldose auf ein Minimum reduziert.

Ueberall da, wo es sich um aseptisches Arbeiten handelte, wurden die für mikrobiologische Untersuchungen allgemein geltenden Vorschriften befolgt (z. B. Heim, 1918; Küster, 1921; Janke-Zikes, 1928). Die eben erwähnten Manipulationen wurden zudem in einem selbstgebauten Impfkasten (s. Abb. 5) vorgenommen, der folgendermassen konstruiert ist : Boden und Seitenwände sind aus Sperrholz, Vorderwand, Rückwand und Decke aus Glas. Die Seitenwände weisen je eine runde Oeffnung von 10 cm Durchmesser auf, die mit einem 10 cm langen Gummistutzen versehen ist. Dieser Gummistutzen, der das Eindringen von Keimen während der Arbeit erschwert, ermöglicht auch das genaue Einpassen von hölzernen Deckeln, die den Impfkasten nach aussen abschliessen. Der Boden ist versenkbar und ebenfalls mit einer Dichtung aus Gummi versehen. Bei Nichtgebrauch steht im Kasten ständig eine Schale mit Formaldehyd zur Desinfektion des Innenraumes. Die Formaldehyddämpfe werden vor Gebrauch des Kastens durch Ammoniak unschädlich gemacht.

Nach Erstarren des Agars werden die Deckeldosen in einem dunkeln Raume bei Zimmertemperatur aufgestellt, und zwar die für Wurzelkulturen bestimmten umgedreht und die für Spross- und Mesokotylkulturen bestimmten aufrecht. Dadurch wird es möglich, dass die jeweils zum Versuch benötigten Organe trotz ihrer verschiedenen geotropischen Reaktion immer von der Agarschicht weg in den Luftraum der Dose hineinwachsen.

e) Abtrennen der Organe.

Die aseptische Entnahme der verschiedenen Teile der Keimpflanze verlangt grösste Vorsicht, da bei dieser Manipulation die Gefahr einer Infektion besonders gross ist. Anfänglich wurden die Organe entsprechend den Angaben früherer Autoren (Kotte, 1922; Robbins, 1923; White 1932) mit Schere oder Skalpell abgetrennt. Bald zeigte sich jedoch, dass *Abbrennen* mit einem glühenden Platindraht ein geeigneteres Verfahren darstellt, und zwar sowohl im Hinblick auf einfache Handhabung und einwandfrei aseptisches Arbeiten, als auch auf ein gleichmässiges Wachstum; es wurde nämlich öfters beobachtet, dass abge*brannte* Wurzelstücke besser und gleichmässiger wuchsen als abgeschnittene. Zum Abbrennen der zu kultivierenden Organe hat sich der in Abb. 3 wiedergegebene, selbst konstruierte Thermokauter bewährt. Bei Vergleich mit der am Thermokauter markierten Strecke V ist es möglich, alle zur Verwendung kommenden Teile der Keimpflanze in mehr oder weniger gleicher Länge abzutrennen.

Das Abbrennen geschieht im Impfkasten; vorher werden Arbeitsplatz und Hände mit « Zephirol » desinfiziert und die Instrumente abgeflammt. Die Deckeldosen, welche die zu verwendenden Keimpflanzen enthalten, werden unmittelbar vor Gebrauch im Impfkasten aufgestellt. Mit der rechten Hand wird der Deckel der Dose so hoch gehoben, dass das in Aussicht genommene Korn mit einer abgeflammten Nadel aufgespiesst und aus der Dose entfernt werden kann. Mit der linken Hand, die die Nadel mit dem Korn hält, wird jetzt der bereits vorher ausser-

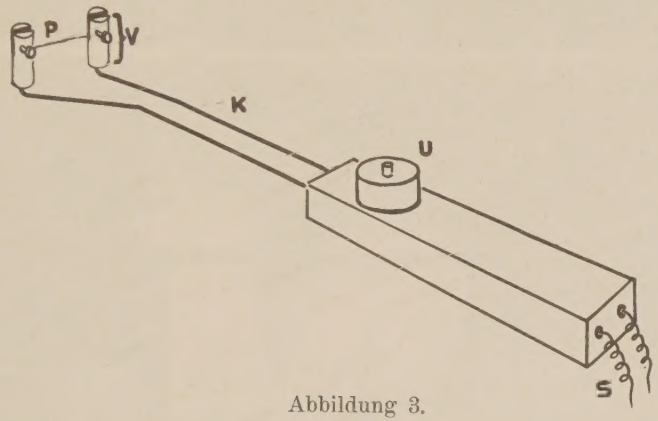

Abbildung 3.
Thermokauter.
V = Vergleichsstrecke; K = Kupferdrähte; P = Platindraht;
U = Stromunterbrecher; S = Stromzufuhr.

halb des Impfkastens abgeflammte Wattezapfen des Kulturgefässes entfernt, das Kulturobjekt wird über der Oeffnung des Kulturgefässes abgebrannt und fällt direkt in die sterile Nährlösung; es kommt also bei dieser Methode nur mit dem glühenden, daher stets keimfreien Draht in Berührung (siehe Abb. 4).

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende, in Abb. 5 schematisch dargestellten Teile der Keimpflanze abgetrennt und kultiviert.

W u r z e l : Wenn die Keimwurzel eine Gesamtlänge von ungefähr 20 mm erreicht hat, was je nach Alter des Kornes und Keimungstemperatur 3—5 Tage braucht, werden durchschnittlich 15 mm lange Stücke abgetrennt. Die Anfangslänge von 15 mm wurde aus folgenden Erwägungen heraus gewählt. Nach Went und Kostytschew (1931) ist die Länge der Wachstumszone weitgehend für die Wachstumsgeschwindigkeit verantwortlich. Daher müssen in allen Kulturen eines Versuches zu Beginn gleich lange Teile der Wachstumszone enthalten sein; dies ist technisch nur möglich durch Erfassen der *ganzen* Wachstumszone. Bei der Wahl von 15 mm langen Wurzelstücken entfällt etwa ein Drittel bis die Hälfte dieser Länge auf Dauergewebe, also ist sicher die ganze

Wachstumszone enthalten. Kleine Längenunterschiede zwischen den einzelnen Kulturobjekten stellen höchstens geringfügige Unterschiede in der Menge des vorhandenen Dauergewebes dar und wirken nicht störend. Die Wahl von 15 mm langen Wurzelstücken steht im Gegensatz zu den Arbeiten früherer Autoren (Kotte, 1922; Robbins, 1922; White, 1932), die von andern Fragestellungen (z. B. Regenerationsproblemen) ausgehend, nur bis 5 mm lange Stücke verwendet haben.

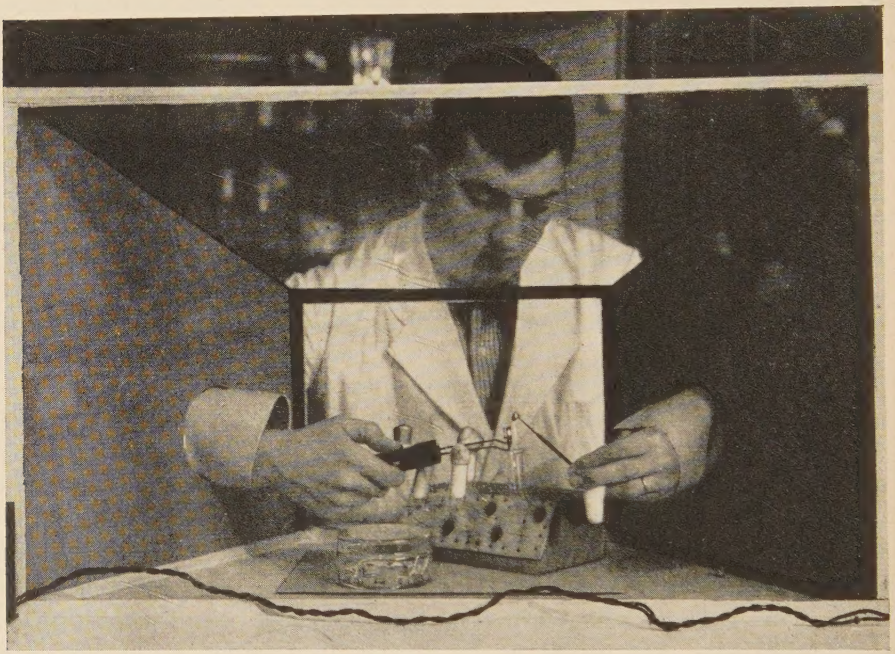

Abbildung 4.

Arbeitsweise bei aseptischer Entnahme von Kulturobjekten im Impfkasten.
(Erklärung auf Seite 525.)

Spross: Wenn der Keimspross (Mesokotyl plus Koleoptile) eine Länge von ungefähr 30 mm erreicht hat, was bei den gewählten Versuchsbedingungen nach 4—6 Tagen der Fall ist, werden die zu kultivierenden Sprossteile etwa 2 mm unterhalb des Sprossvegetationspunktes abgetrennt.

Mesokotyl (nach Boyd and Avery [1936] = das *erste Sprossglied*): Erfolgt die Keimung im Dunkeln bei Zimmertemperatur, so erreicht das Mesokotyl nach 5—8 Tagen eine Länge von ungefähr 50 mm; davon werden Teile von 12—15 mm Länge abgetrennt und zur Kultur verwendet.

f) Organkultur.

Zur Kultur wurden ausschliesslich Gefässe aus Jenaglas verwendet, die jeweils vor Gebrauch eingehend chemisch gereinigt wurden, mit besonderer Berücksichtigung der biologischen Anforderungen. Nach vorausgegangenem Spülen mit Brunnenwasser folgte Einlegen in heisse Chromschwefelsäure (⅔ heissgesättigte Kaliumbichromatlösung plus ⅓ konzentrierte Schwefelsäure), nachher viermaliges Spülen mit Brunnen-

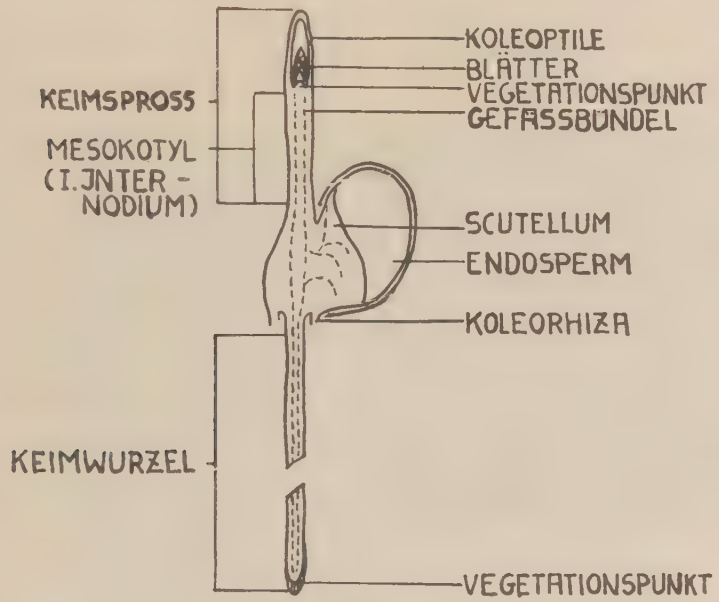

Abbildung 5.
Keimpflanze von Zea Mays.
(Schematisch dargestellt nach Handschnitten.)

wasser und endlich Ausdämpfen während 5—10 Minuten. Das Beschicken mit strömendem Dampf geschieht in der Absicht, den am Glase haftenden Film von Chromverbindungen zu zerstören; durch das sich niederschlagende Wasser wird das Gefäss mit frischdestilliertem Wasser ausgespült. Sofort nach dem Ausdämpfen werden die Gefässe mit Nährlösung gefüllt, mit einem gut sitzenden Wattepfropfen verschlossen und an drei aufeinanderfolgenden Tagen im Dampftopf während je einer halben Stunde sterilisiert.

Für die Wahl der *Form* der zu verwendenden Kulturgefässe waren folgende Gesichtspunkte bestimmend:

1. Die Kulturen müssen während der ganzen Versuchsdauer ruhig stehen, doch müssen die Kulturobjekte auch ständig beobachtet und gemessen werden können.

2. Um den notwendigen Gasaustausch zu ermöglichen, darf, wie Vorversuche zeigten, die Kulturflüssigkeit höchstens eine Schicht von 10 mm über dem Versuchsobjekt bilden.
3. Form und Grösse der Kulturgefässe müssen handlich sein und eine rationelle Arbeitsweise ermöglichen.

Spezielle Angaben über die gewählten Kulturgefässe finden sich in der Beschreibung der Kultur der einzelnen Organe (siehe S. 530 oben).

Als *Kulturmedium* wurde eine von Robbins modifizierte Pfeffersche Nährlösung verwendet; sie enthält in 6000 cc destilliertem Wasser: 2 g $Ca(NO_3)_2$, 0,5 g KH_2PO_4, 0,5 g KNO_3, 0,5 g $MgSO_4$, 0,25 g KCl und 0,005 g $FeCl_3$. Als einziger organischer Nährstoff wurde reine, wasser-

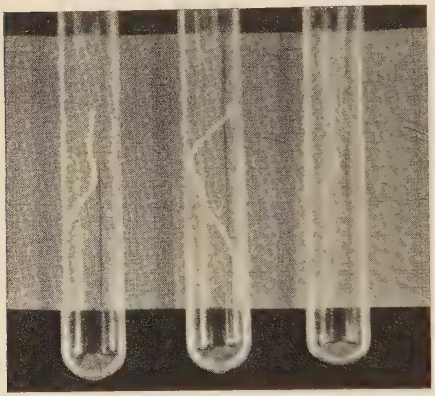

Abbildung 6.
Kultur von Maiswurzeln in liegenden Reagenzgläsern mit aufgebogenem Halse, die auf Millimeterpapier stehen.
Links: Wurzel in Pfefferscher Nährlösung + 1 % Glukose nach acht Tagen Organkultur.
Mitte: Wurzel in gleicher Nährlösung wie links; nach zwei Tagen erfolgte Zugabe einer *fördernden* Wuchsstoffkonzentration. Kulturdauer: acht Tage.
Rechts: Gleiche Bedingungen wie Mitte, aber Zugabe einer *hemmenden* Wuchsstoffkonzentration.

freie Glukose (Glycosum purissimum anhydricum Siegfried P. H. V.) zugesetzt. Vor Einfüllen in die Kulturgefässe wurde die Nährlösung einmal gekocht.

Die *Reaktion* der obgenannten Lösung war zu Beginn des Versuches pH 4,7; in der gewählten Versuchsdauer von im allgemeinen vierzehn Tagen veränderte sich der Wert der Nährlösung *ohne* lebendes Organ in alkalischer Richtung und stieg auf pH 5,3. Dagegen stieg der Wert in einem Gefäss, das beispielsweise eine Wurzel enthielt, in vierzehn Tagen, d. h. während die Wurzel von etwa 15 auf etwa 45 mm Länge auswuchs, auf pH 6,5. Für diese Veränderung ist wohl die ungleiche Aufnahme von Anionen und Kationen durch das wachsende Organ verantwortlich zu machen. Die einzelnen Teile der Keimpflanze wurden wie folgt kultiviert:

Wurzelkultur: Anfänglich wurden grosse Kolben mit flachem Boden verwendet, wobei die darin enthaltenen Wurzeln (bis zu 10 Stück) durch Anlegen eines gläsernen Maßstabes an den Kolbenboden gemessen wurden. Ausser den individuellen Unterschieden im Wachstum der zu vergleichenden Wurzeln — hauptsächlich bedingt durch verschiedenen

Entwicklungszustand und verschiedene Anfangslänge — zeigte sich wiederholt die Erscheinung, dass in Kulturgefässen mit mehreren Wurzeln zwei nahe beieinanderliegende ein stark verschiedenes Wachstum aufweisen; die eine wuchs normal, oft überdurchschnittlich stark, das Wachstum der andern dagegen schien stark gehemmt Diese Beobachtung wurde nicht weiterverfolgt, führte aber mit dazu, ausschliesslich mit *Einzel*kulturen zu arbeiten.

Für die getrennte Kultur einzelner Wurzeln wurden anfänglich Erlenmeyerkölbchen verwendet, die auf Glasplatten standen und somit Beobachtung und Messung ohne Verschieben der Gefässe gestatteten. Eine genaue Messung wurde jedoch infolge von Brechungserscheinun-

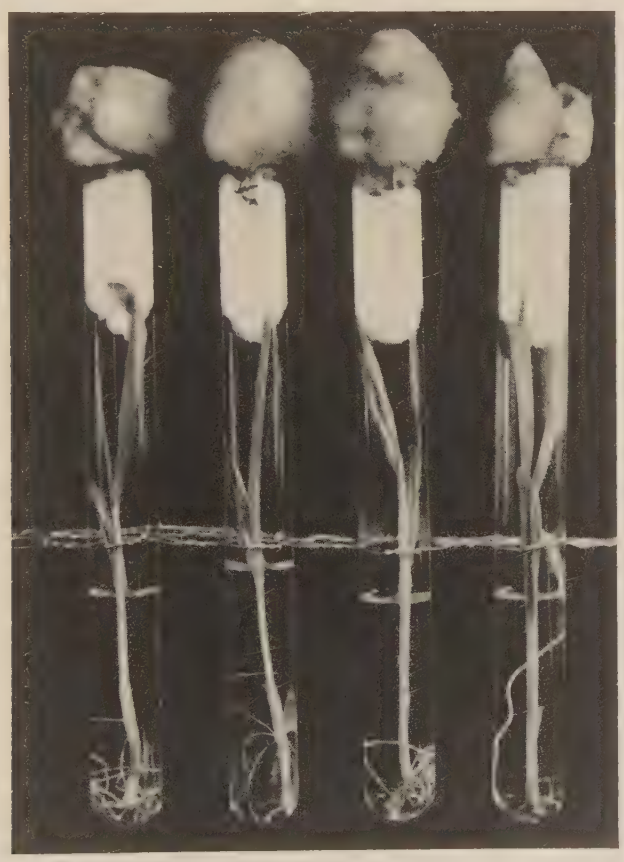

Abbildung 7.
Kultur von Maissprossen in Reagenzgläsern.
Alter der Pflanzen : 4 Wochen.
Kulturbedingungen :
Pfeffersche Nährlösung + 2% Glukose; ca. 18° C.

gen sehr erschwert. Ferner konnten die Wurzeln, nachdem sie eine Länge von ungefähr 40 mm erreicht hatten, der auftretenden Krümmungen wegen im allgemeinen nicht länger als etwa 7 Tage beobachtet werden. Erst die Verwendung von liegenden Reagenzgläsern mit aufgebogenem Halse gestattete, alle obgenannten Schwierigkeiten zu vermeiden. Die Reagenzgläser werden durch eine Wäscheklammer gehalten und stehen auf Millimeterpapier (s. Abb. 6); diese Anordnung ermöglicht ständige Beobachtung der Kulturen, ohne dieselben zu bewegen, und Messung der Wurzeln auf dem Millimeterpapier. Die Höhe der Flüssigkeitsschicht beträgt bei Verwendung von 18 × 180 mm Reagenzgläsern, die 20 cc Nährlösung enthalten, überall etwa 10 mm, bei 10 cc Nährlösung etwa 7 mm. Die Kultur der isolierten Wurzeln erfolgte bei Dunkelheit in einem Kellerraum bei 18—22° C; die Temperaturschwankungen während eines Versuches betrugen etwa ½—1° C. Die Messungen und Beobachtungen erfolgten beim Lichte einer schwachen elektrischen Lampe.

Wurden die Kulturen einige Zeit am Tageslicht stehengelassen, so färbten sich die Wurzeln rot.

Sprosskultur: Für die Sprosskulturen wurden Reagenzgläser, gelegentlich auch längere Kulturröhren, verwendet. Die Gläser werden zu Beginn der Kultur schräg gestellt, und das untere Ende wird verdunkelt. Diese Massnahmen ermöglichen dem abgetrennten, insgesamt etwa 6—10 mm langen, obersten Sproßstück, das auf der Oberfläche der Kulturlösung schwimmt, der Wand des Reagenzglases nach emporzuwachsen; Spross und Wurzel orientieren sich dabei phototropisch normal, entsprechend dem verdunkelten Ende des Glases. Nach einer Woche sind die Pflanzen so weit ausgewachsen, dass sie bei Bewegungen der Kulturgläser nicht mehr umkippen können. Die Gläser dürfen jetzt aufrecht gestellt werden, ihre untere Hälfte bleibt mit schwarzem Tuch oder Papier umhüllt.

Mesokotylkultur: Die Mesokotylstücke wurden in kleinen Erlenmeyerkölbchen von 100 cc Inhalt oder in liegenden Reagenzgläsern bei Dunkelheit und ungefähr 18° C kultiviert.

Beispiele für die Anwendung der Organkultur bei physiologischen Untersuchungen.

I. Wachstum der Wurzel in Organkultur.

Die in Organkultur gezüchtete Wurzel zeigt im Wachstum weder makroskopisch noch mikroskopisch sichtbare Unterschiede gegenüber einem in Erde gewachsenen Exemplar. Das *Längenwachstum* verläuft während der Versuchsdauer von durchschnittlich 8—14 Tagen, wie sie bei der vorliegenden Arbeit gewählt wurde, *gleichmässig*. Tägliche Messungen ergeben eine Wachstumskurve, wie sie z. B. in Abbildung 8

wiedergegeben ist. Trockengewichtsbestimmungen ergaben eine weitgehende Uebereinstimmung mit den Längenmessungen; während der gewählten Versuchsdauer, also *vor* Auftreten von Seitenwurzeln, betrug das Trockengewicht 100—120 γ pro mm Wurzel.[1]

Zur Beobachtung der weiteren Entwicklung wurden die Wurzeln verschiedentlich während einer längern Zeit in Organkultur gehalten. Unter geeigneten Bedingungen (Verabreichung einer genügenden Menge Glukose durch Verwendung von grossen Kolben mit flachem Boden,

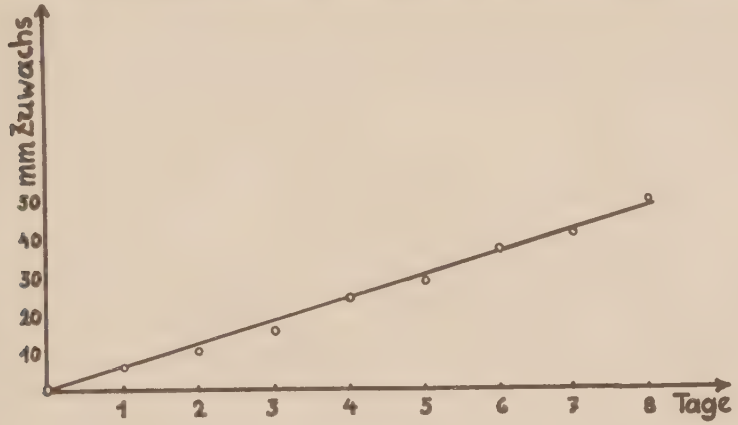

Abbildung 8.
Durchschnittlicher täglicher Zuwachs von 5 Maiswurzeln in keimfreier Organkultur (Pfeffersche Nährlösung + 1% Glukose; Dunkelheit; 18° C).

die bei 10 mm Höhe der Flüssigkeitsschicht mit 100 cc Nährlösung versehen werden können) wuchsen die Wurzeln weiter bis zu einer maximalen Länge von 30—40 cm und bildeten auch viele Seitenwurzeln. In einem speziellen Falle wurden an einer Wurzel nach 150 Tagen Organkultur 391 Seitenwurzeln I.—VI. Ordnung festgestellt; die Wurzel hatte eine Länge von 21 cm erreicht.

Die *geotropische Empfindlichkeit* bleibt in der Organkultur erhalten; zu ihrer Feststellung wurden die Wurzeln aus der Organkultur in einen feuchten Raum gebracht, wo sie schon nach wenigen Stunden positiv geotropisch reagierten.

Die Tatsache, dass Wachstum und geotropische Empfindlichkeit der Wurzel in Organkultur weitgehend der normalen, am Korn und in Erde ausgewachsenen Wurzel entsprechen, lässt die gewählten Kulturbedingungen als günstig erscheinen.

Der *Glukoseverbrauch* der Wurzel in Organkultur ist gering. Zum Beispiel zeigte in 10 cc Pfefferscher Nährlösung mit einem anfänglichen

[1] 1 $\gamma = 10^{-6}$ g.

Glukosegehalt von 1 % eine Wurzel von 20 mm Anfangslänge in 15 Tagen einen Zuwachs von 35 mm; die Zuckerkonzentration betrug nach dem Versuche und unter Berücksichtigung der Verdunstung noch 0,87 % (titriert mit Fehlingscher Lösung !). Der Zuckerverbrauch der Wurzel für die Atmung und für die Bildung von etwa 3,5 mg Trockensubstanz betrug demnach 13 mg. Daraus errechnet sich für den ökonomischen Koeffizienten, d. h. das Verhältnis zwischen gebildeter Trockensubstanz und verbrauchter organischer Nahrung (Benecke-Jost, 1924, *I*, S. 324 ff.) der Wert 0,27. Nach Kostytschew (1926; S. 230) wurde der höchste ökonomische Koeffizient bei Pilzen erreicht; er beträgt unter optimalen Kulturbedingungen bei Zuckerernährung 0,33. Auch dieser Vergleich spricht für die Eignung der in vorliegender Arbeit angewendeten Kulturmethode.

II. Einfluss verschiedener Zuckerkonzentrationen auf das Längenwachstum der Wurzel.

Aseptisch entnommene Keimwurzeln wurden in Kulturgefässe gebracht, welche Pfeffersche Nährlösung und verschiedene Zuckerkonzentrationen enthielten. Um das Maximum und das Minimum der wirksamen Glukosekonzentration zu erfassen, wurden neben einer glukosefreien Versuchsserie acht, in Dreierpotenzen abgestufte Zuckerkonzentrationen zwischen $^1/_{81}$ % und 27 % (0,00068 molar, resp. 1,485 molar) gewählt. In der Nährlösung mit einem Zuckergehalt von 27 % starben die Wurzeln kurz nach dem Einbringen ab; die ungünstigen osmotischen Verhältnisse in dieser Kulturflüssigkeit lassen dies zum vornherein erwarten. Bei allen andern Glukosekonzentrationen zeigte sich dagegen deutliches Wachstum, dessen Grösse an einem Beispiel in Abbildung 9 dargestellt ist. Die Kurve hat den Charakter einer ausgesprochenen Optimumkurve; das Wachstumsoptimum liegt bei der Glukosekonzentration 3 %. (Da die Wurzeln in der optimalen Glukosekonzentration oft schon in den ersten Tagen starke Krümmungen aufwiesen, wurden später bei den Hormonversuchen mit *einer* Glukosekonzentration die Werte 1 % resp. 2 % gewählt, bei denen der Grossteil der Wurzeln mehr oder weniger gerade und darum messbar bleibt.)

Die Glukosekonzentration von 3 % zeigt auch bei mehr als 6 Tage dauernder Kultur optimale Wirkung; das Optimum verschiebt sich also nicht nach andern Werten, was wohl mit dem geringen Zuckerverbrauch der Wurzel zusammenhängt. Der Verlauf der Kurve zeigt ferner, in Uebereinstimmung mit dem Ergebnis der Glukosebestimmung (s. oben), dass noch sehr niedrige Zuckerkonzentrationen das Wachstum der Wurzel fördern. Ein geringes Wachstum erfolgt — wenigstens eine Zeitlang — auch in zucker*freier* Nährlösung; es ist offenbar mit den in der Wurzel selbst noch vorhandenen Nährstoffen zu erklären.

III. Einfluss verschiedener Wuchsstoffkonzentrationen auf das Längenwachstum der Wurzel.

Die hier an besondern Beispielen dargestellten Resultate dienen zur Bestätigung und Ergänzung der bereits früher gemachten Angaben (s. Geiger-Huber und Burlet, 1936).

Anfänglich wurde der Kulturlösung vor Beginn des Versuches eine bestimmte Wuchsstoffkonzentration zugesetzt. Durch täglich vorgenom-

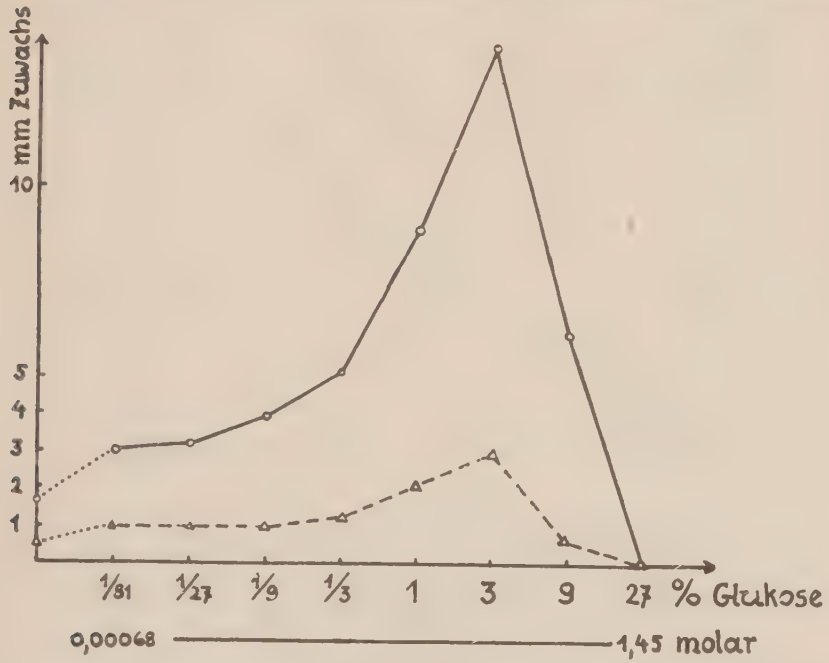

Abbildung 9.
Durchschnittlicher Zuwachs von je 6—10 Maiswurzeln in keimfreier Organkultur in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration nach 2 (– – △ – –) und nach 6 (——○——) Tagen.
Ordinate: Zuwachs in mm.
Abszisse: logarithmische Darstellung der Glukosekonzentration.

mene Messungen erfolgte Vergleich der in wuchsstoffhaltigen Lösungen gewachsenen Wurzeln mit einer entsprechenden Anzahl zu gleicher Zeit in wuchsstofffreien Lösungen gewachsenen Exemplaren.

Selbst wenn Durchschnittswerte aus etwa 15 Messungen genommen werden, treten immer noch deutliche individuelle Unterschiede im Wachstum der einzelnen Versuchsserien auf. Diese Unterschiede beruhen hauptsächlich darauf, dass einzelne Wurzeln einen geringen, andere dagegen einen sehr grossen Zuwachs aufweisen. Deshalb wurde

später die Tatsache ausgenützt, dass der Zuwachs der Wurzeln in den ersten 8—14 Tagen der Kultur gleich bleibt (s. Abb. 8); der Zuwachs der Wurzeln in den ersten zwei bis vier Tagen *vor* Wuchsstoffzugabe wurde verglichen mit dem spätern Zuwachs *nach* Zugabe von Wuchsstoff. Auf diese Weise war es möglich, die individuellen Schwankungen

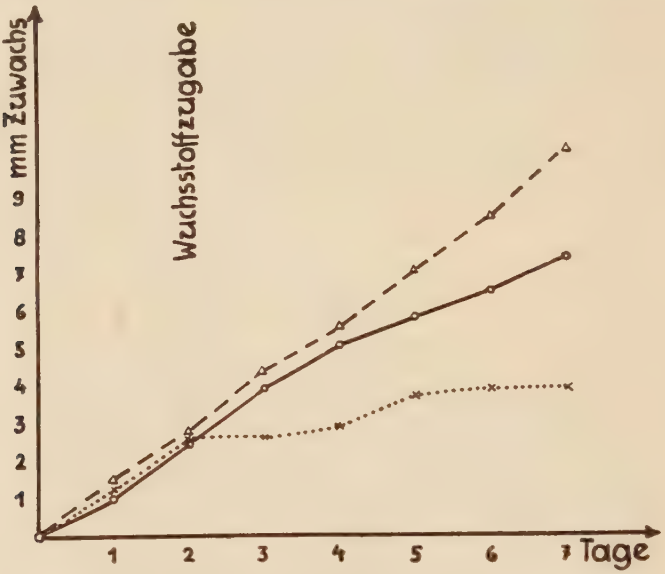

Abbildung 10.
Veränderung des täglichen Zuwachses von je 10 Maiswurzeln in Organkultur durch Zusatz einer fördernden (— —) resp. hemmenden (·····) Wuchsstoffkonzentration in den ersten fünf Tagen nach der Wuchsstoffzugabe, verglichen mit unbehandelten (——) Kontrollexemplaren.

im Zuwachs enger zu halten, indem vor dem Zusatz von Wuchsstoff alle jene Wurzeln eliminiert wurden, die krumm gewachsen waren oder extreme Zuwachswerte aufgewiesen hatten (s. a. Geiger-Huber und Burlet, 1936). Der Vorteil dieser Versuchsanordnung besteht erstens darin, dass die Mittelwerte für den Zuwachs eine geringere Streuung aufweisen und zweitens darin, dass der Zuwachs an den *gleichen* Wurzeln *vor* und *nach* der Wuchsstoffzugabe verglichen wird und nicht, wie dies früher geschah, der Zuwachs der behandelten Wurzeln mit dem Zuwachs einer parallelen wuchsstofffreien Versuchsserie. Um jedoch eine doppelte Kontrolle zu haben, wurde die parallele wuchsstofffreie Kontrollserie bei allen Versuchen beibehalten.

Die Zugabe der sterilisierten Wuchsstofflösung erfolgte mit trockensterilisierten (1- -2 Stunden 150° C) Pipetten ohne Bewegen der Kulturgefässe. Bei dem verwendeten Wuchsstoff handelte es sich um synthe-

tische, kristallisierte β-Indolylessigsäure der Firma F. Hoffmann-La Roche in Basel. Nach der Wuchsstoffzugabe wurde durch leichtes einseitiges Heben und Senken des Brettes, auf dem die Kulturgefässe standen, die Kulturflüssigkeit möglichst gleichmässig mit der Wuchsstofflösung vermischt.

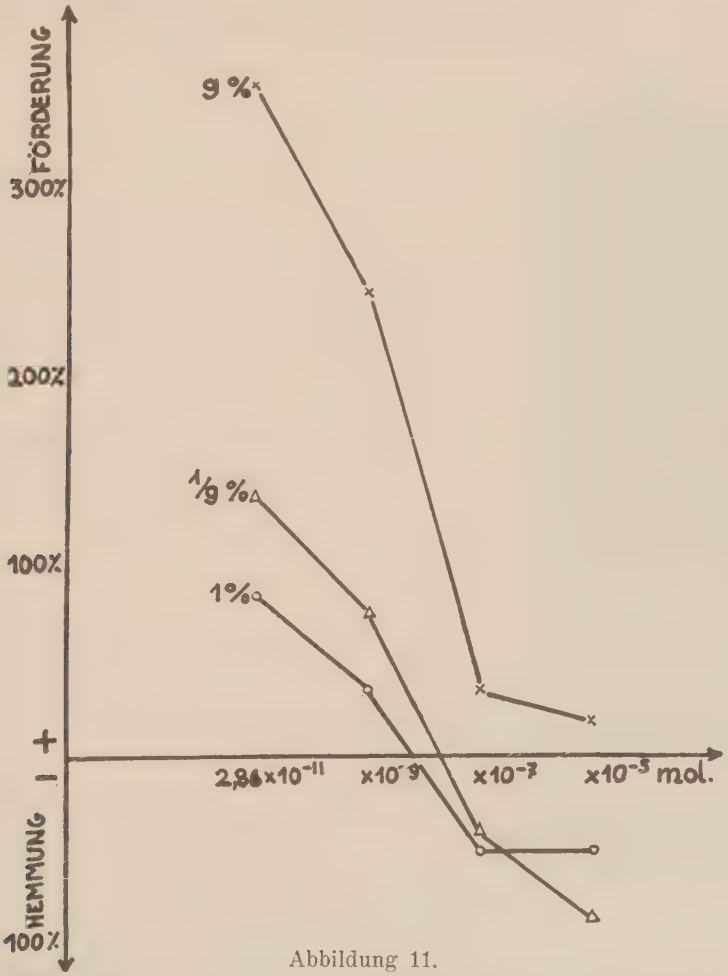

Abbildung 11.

Durchschnittlicher Zuwachs von 6 Wurzeln von Zea Mays in Nährlösungen mit verschiedenen Glukosekonzentrationen (× = 9 %; o = 1 %; △ = 1/9 %), zwei Tage vor und zwei Tage nach Zusatz verschiedener Heteroauxinlösungen. Förderung und Hemmung sind berechnet nach $\frac{ZH - ZO}{ZO} \cdot 100 = \%$ Wirkung; ZO = Zuwachs *ohne*, ZH = Zuwachs mit Heteroauxin.

Ordinate: Förderung resp. Hemmung in %.

Abszisse: Molare Lösung des Wuchsstoffes in der Kulturlösung.

Ein Beispiel für die Wirkung der Wuchsstoffzugabe ist in Abbildung 10 dargestellt (s. a. Geiger-Huber und Burlet, 1936, S. 242). Das Wachstum der unbehandelten Wurzeln verläuft hier während 7 Tagen gleichmässig; erfolgt jedoch nach 2 Tagen Zugabe von Wuchsstofflösungen, die in einem Falle im Kulturmedium eine wachstumhemmende, im andern Falle eine wachstumfördernde Wuchsstoffkonzentration erzeugen, so zeigen die Wurzeln sehr bald eine entsprechende Reaktion;

Abbildung 12.
Maispflanzen aus keimfreier Organkultur.
Links: oberstes Sproßstück der Keimpflanze zu Beginn der Kultur.
Rechts: Maispflanze nach vierzehntägiger Kultur in Nährlösung mit wachstumförderndem Wuchsstoffzusatz; Heteroauxinkonzentration in der Nährlösung $= 2{,}86 \times 10^{-8}$ molar.
Mitte: Kontrollpflanze nach vierzehntägiger Kultur in wuchsstofffreier Nährlösung.

in einer ungefähr 3×10^{-5} molaren Lösung verringerte sich der tägliche Zuwachs bis auf 20 % des Wertes in wuchsstofffreier Lösung, während sich in einer ungefähr 3×10^{-11} molaren Lösung der Wert des täglichen Zuwachses um 100 % oder mehr vergrössert.

Im folgenden Beispiel ist der Einfluss *verschiedener Wuchsstoffkonzentrationen* auf das Längenwachstum von Wurzeln dargestellt, die zudem in einer Nährlösung mit *verschiedenen Glukosekonzentrationen* wachsen; die verwendeten Nährlösungen enthielten $^1/_9$ %, 1 % und 9 % Glukose. Obwohl aus Abbildung 9 hervorgeht, dass das Wurzelwachstum in Nährlösungen mit den Zuckerkonzentrationen $^1/_9$ % und auch 9 % erheblich geringer ist als bei 1 %, so zeigt doch die Abbildung 11, dass *schwache* Wuchsstoffgaben in *allen* Fällen *fördernd* auf das Wurzelwachstum wirken; *starke* Wuchsstoffgaben bewirken Wachstums*hemmung* oder bei hohen Zuckerkonzentrationen eine allerdings nur geringe Förderung, wie sie für eine starke Verschiebung der relativen Konzentrationen von Wirkstoff und Baustoff wohl erwartet werden darf. Interessant ist auch die Tatsache, dass die maximale Wuchsstoffwirkung in allen Fällen (Abb. 11) bei der gleichen Wuchsstoffkonzentration auf-

tritt, wenigstens soweit der Konzentrationseffekt untersucht wurde (Veränderung der Wuchsstoffkonzentration bis um das Millionenfache !).

IV. Einfluss von Wuchsstoff auf das Wachstum des Sprosses.

Die isolierten, d. h. von Endosperm und Wurzel abgetrennten Sprosse zeigen in Organkultur eine Entwicklung, die derjenigen der

Abbildung 13.
Monströse Maispflanze aus Organkultur; Missbildung verursacht durch hohe Wuchsstoffgabe. (Zirka 1/1 nat. Grösse.)

normalen, in Erde gewachsenen Keimpflanze ähnlich ist (s. Abb. 7). Nach einer gewissen Kulturdauer wachsen am Mesokotyl Adventivwurzeln aus, die Blätter zeigen die natürliche grüne Färbung, und die mikroskopische Untersuchung lässt die Anlagen von Blütenständen erkennen. Endospermfrei gezogene Pflanzen wuchsen auch in Erde normal weiter.

Der *Einfluss von Wuchsstoff*, der in gleicher Weise verabreicht wurde wie bei den Wurzelkulturen, ist nur roh untersucht worden (s. Abb. 12); da nämlich die Auswahl von einheitlichem Ausgangsmate-

rial bei Sprossen wesentlich schwieriger ist als bei Wurzeln, wurde von einer quantitativen Auswertung der experimentalen Ergebnisse abgesehen.

Die Wirkung verschiedener Wuchsstoffkonzentrationen zeigte sich in einer mehr oder weniger deutlichen Förderung, resp. in einer eindeutigen Hemmung des Wachstums gegenüber Kontrollexemplaren in wuchsstofffreier Lösung. Die absoluten Werte für die fördernden Wuchsstoffkonzentrationen lagen für *Sprosse höher als für Wurzeln;* bei Konzentrationen, die niedriger waren als $2{,}86 \times 10^{-7}$ molar, blieb das Wachstum entweder unbeeinflusst oder wurde etwas gefördert. Die Wuchsstoffkonzentration $2{,}86 \times 10^{-5}$ molar, die auf das Wurzelwachstum stark hemmend (s. Geiger-Huber und Burlet; Abb. 1) und schliesslich tödlich wirkt, führt bei Sprosskulturen nur zu *abnormalen Wachstumserscheinungen.* Die Pflanze erscheint nämlich in ihrer Entwicklung wesentlich gestört; vor allem *fehlen* die *natürlichen Proportionen zwischen den einzelnen Organen.* Die in Abbildung 13 dargestellte Keimpflanze zeigte beispielsweise ein übernormal starkes Längen- und Dickenwachstum der Adventivwurzeln; die Koleoptile wuchs im Gegensatz dazu fast gar nicht aus, bildete aber *an der Spitze Adventivwurzeln.* Ferner wuchsen die Blätter abnormal stark in die Breite, verdickten sich wulstig und sprengten die Koleoptile an ihrer Basis auf. Die in Abbildung 7 dargestellten Keimpflanzen sind etwa gleich alt wie die in Abb. 13 dargestellte, sind aber ohne Einfluss von zusätzlichem Wuchsstoff normal ausgewachsen.

V. Einfluss von Wuchsstoff auf die Bildung von Adventivwurzeln an isolierten Mesokotylstücken.

Nachdem sich bei Wurzelkulturen oft die Erscheinung gezeigt hatte, dass Wurzeln aus Nährlösungen mit hohem Wuchsstoffgehalt auf der ganzen Oberfläche dicht mit Wurzelanlagen bedeckt waren (siehe Geiger-Huber und Burlet, 1936, S. 239), wurde die Eigenschaft des verwendeten Wuchsstoffes als wurzel*bildende* Substanz näher untersucht. An Keimwurzeln kann die Feststellung einer eventuellen *Neubildung* von Wurzeln nur schwer durchgeführt werden, denn selbst wenn die bei normalem Wachstum auftretende Wurzelzahl gleich bleibt, so erscheint sie grösser, weil die Seitenwurzeln infolge des gehemmten Längenwachstums der Hauptwurzel sehr dicht beieinanderstehen.

Dagegen erscheinen isolierte Stücke des Mesokotyls für derartige Untersuchungen aussichtsreich, denn sie können in Organkultur bis etwa 6 Wochen lang am Leben gehalten werden, zeigen *kein Längenwachstum* und bilden normalerweise in *wenigen Fällen* und nur *vereinzelte* Adventivwurzeln. Deshalb wurde an Mesokotylstücken untersucht, ob die Fähigkeit zur Neubildung von Wurzeln durch Wuchsstoffe

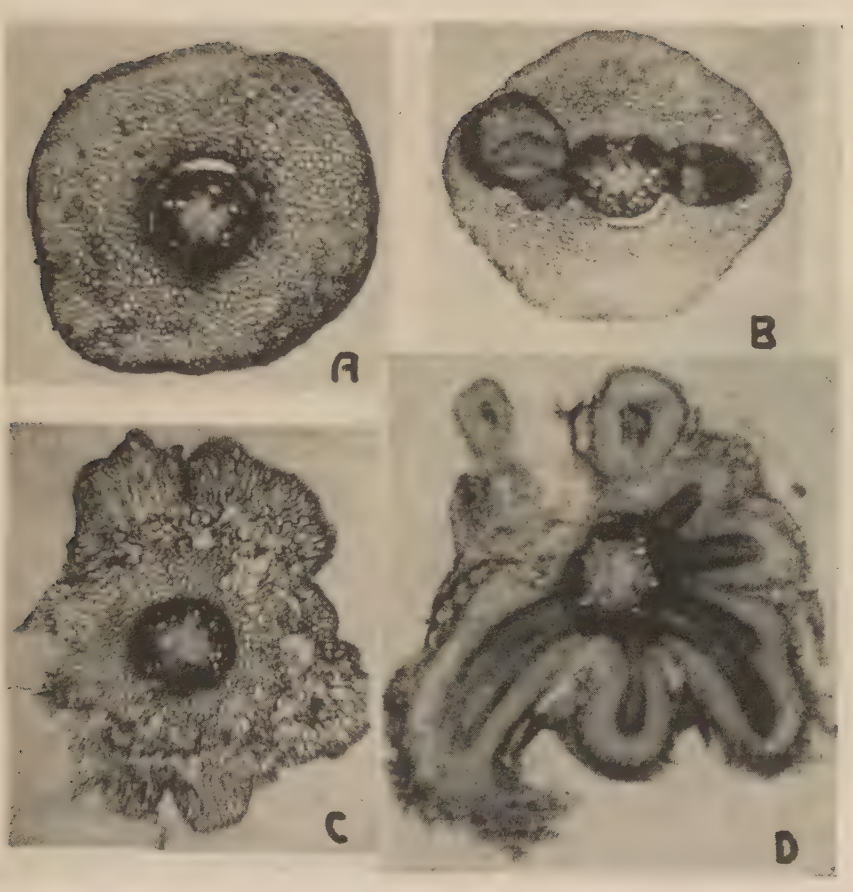

Abbildung 14.

Wirkung von Wuchsstoff auf Mesokotylstücke in keimfreier Organkultur.

A. Querschnitt durch ein Mesokotylstück nach fünfwöchiger Organkultur in wuchsstoff*freier* Nährlösung; keine Adventivwurzeln!

B. Querschnitt durch ein Mesokotylstück zwei Wochen nach Behandlung mit *schwacher* Wuchsstoffkonzentration (ca. $5{,}7 \times 10^{-10}$ molar). Anlage von zwei Adventivwurzeln, die bei weiterer Kultur auswachsen.

C. Querschnitt durch ein Mesokotylstück *zwei* Wochen nach Behandlung mit *starker* Wuchsstoffkonzentration (ca. $5{,}7 \times 10^{-5}$ molar). Verdickung und Aufwölbung der Rinde.

D. Querschnitt durch ein Mesokotylstück *5—6* Wochen nach Behandlung mit *starker* Wuchsstoffkonzentration (ca. $5{,}7 \times 10^{-5}$ molar). Anlage von vielen Adventivwurzeln, die auszuwachsen beginnen.

beeinflusst wird. Bei der Kultur von isolierten Mesokotylstücken bilden bei den gewählten Versuchsbedingungen nur etwa ein Drittel aller verwendeten Exemplare Adventivwurzeln, deren Zahl 1—3 oder vereinzelt bis 5 betragen kann. Die restlichen Mesokotylstücke (*ohne* Adventivwurzeln) bilden das Ausgangsmaterial für Untersuchungen über die Neubildung von Wurzeln, da sie auch bei längerer Kulturdauer *ohne Wuchsstoff keine Wurzelbildung zeigen.* Im Gegensatz hierzu bilden *Mesokotylstücke,* die mit *Koleoptilen, Blättern* und *Vegetationspunkt in Verbindung bleiben,* nach einer Woche Organkultur auch *ohne Wuchsstoffzusatz* durchwegs *Adventivwurzeln.*

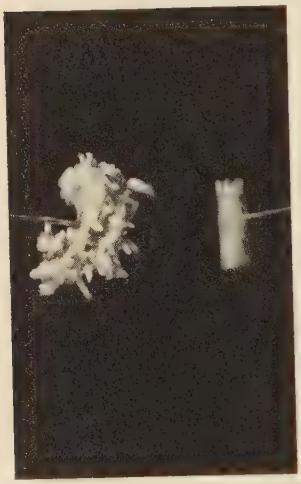

Abbildung 15.
Wirkung von Heteroauxin auf isolierte Stücke des Mesokotyls von Maispflanzen.
Links: Mesokotylstück, das vier Tage lang einer die Neubildung von Adventivwurzeln fördernden Wuchsstoffkonzentration ($2{,}86 \times 10^{-6}$ molar) ausgesetzt worden war, nach viermonatiger Organkultur. Die in grosser Zahl entstandenen Nebenwurzeln sind ausgewachsen, jedoch wird ihr Längenwachstum durch die starke Wuchsstoffkonzentration gehemmt.
Rechts: Kontrolle ohne Einwirkung von Wuchsstoff nach der gleichen Versuchsdauer; das Mesokotylstück ist abgestorben und braun verfärbt.

Da die Wuchsstoffkonzentrationen, welche wurzel*bildend* wirken, nach einiger Zeit zum Tode der Mesokotylstücke führen würden, werden diese nur während 2—5 Tagen in die wuchsstoffhaltige Nährlösung gebracht, um dort den « Impuls » zur Bildung von Wurzelanlagen zu erhalten. Die Bildung dieser Anlagen erfolgt aber erst nach Ueberführung der Mesokotylstücke in wuchsstofffreie Nährlösung. Um die Bedingungen bei Versuch und Kontrolle möglichst gleichmässig zu gestalten, wurden auch die Kontrollexemplare, die von Anfang an in wuchsstofffreier Lösung waren, zu gleicher Zeit in neue Nährlösung übergeführt. Diese Kontrollen zeigten bis zu ihrem Absterben, das nach etwa sechs Wochen erfolgte, weder makroskopisch noch mikroskopisch sichtbare Veränderungen ihrer Gewebe. Im Gegensatz dazu zeigten sich bei Kulturen, die während zwei bis fünf Tagen einer Wuchsstoffeinwirkung von 0,01 % ($5{,}7 \times 10^{-4}$ molar) — 0,0001 % ($5{,}7 \times 10^{-6}$ molar) Heteroauxin ausgesetzt worden waren, nach einer Woche Kultur in wuchsstofffreier Lösung *starke Verdickungen und Aufwölbungen der Rinde.* (Die Konzentration 0.01 % Heteroauxin [ca. 3×10^{-4} molar] stellt das

Maximum dar, denn sie wirkte in einzelnen Fällen schädlich und führte zum Absterben der Kulturobjekte.) Nach weiteren zwei Wochen erschien der Zentralzylinder im Querschnitt dicht mit Anlagen von Adventivwurzeln besetzt. In Kulturen mit vorübergehender Einwirkung von Heteroauxin in niedrigeren Konzentrationen (0,0001 % [$5{,}7 \times 10^{-6}$ molar] — 0,000001 % [$5{,}7 \times 10^{-8}$ molar]) traten weniger Anlagen von Adventivwurzeln auf, konnten aber einigermassen normal auswachsen, da diese Konzentrationen nicht mehr stark hemmend wirkten. In Abbildung 14 ist an einigen Querschnitten durch Mesokotylstücke die verschiedene Einwirkung wurzel*bildender* Wuchsstoffkonzentrationen dargestellt.[1] Abbildung 15 zeigt, dass die gebildeten Wurzelanlagen nach längerer Kulturdauer tatsächlich auch auswachsen können; ferner geht aus Abbildung 15 hervor, dass Mesokotylstücke nach vorübergehender Wuchsstoffeinwirkung länger lebend bleiben als unbehandelte.

* * *

Obwohl die vorliegende Arbeit nur einen Versuch darstellt, die *keimfreie Organkultur* höherer Pflanzen als *physiologische Untersuchungsmethode* experimentell zu begründen, so dürfte doch aus den beschriebenen Versuchen hervorgehen, dass es möglich ist, *höhere Pflanzen endospermfrei* und in *einzelnen Teilen* in Kultur zu halten und zur Entwicklung zu bringen und zwar bei Abwesenheit jeglicher fremder Organismen; dadurch erst wird es prinzipiell möglich, den Stoffwechsel (Nährstoffe, Hormone, Vitamine usw.) der höheren Pflanzen genau zu untersuchen, ohne störende Einflüsse durch die Korrelation zwischen den einzelnen Organen oder auch durch fremde Organismen befürchten zu müssen.

Zusammenfassung.

1. Es wurde eine Methode ausgearbeitet, die es gestattet, verschiedene Teile der Keimpflanze von Zea Mays ohne Endosperm und in keimfreier Organkultur zu kultivieren:

Eine Anzahl Maiskörner werden mechanisch gereinigt, mit Brom desinfiziert, während ungefähr 48 Stunden gequollen und zur Keimung auf sterilen Agar-Agar in sterile Deckeldosen gebracht. Von der Keimpflanze, die im Dunkeln auswächst, werden die zu kultivierenden Teile mit einem glühenden, also keimfreien

[1] Statt die Wurzelbildung an Querschnitten von Mesokotylstücken zu studieren, wäre es besser, die Gesamtwurzelzahl zu erfassen. Dies ist insofern schwierig, als die Anzahl der Wurzelanlagen nur an Schnitten festgestellt werden kann, wenn man nicht auf ihr Auswachsen warten will, was aber in Kultur und beim Vorhandensein vieler Wurzelanlagen recht lange (1½—2 Monate) dauert. Dagegen lässt sich bei richtigem Vergleich verschiedener Querschnitte rasch ein Ueberblick über die Bildung von Wurzelanlagen unter dem Einfluss von Wuchsstoff erhalten.

Platindraht (Elektrokauter) abgebrannt und in Pfefferscher Nährlösung mit Glukosezusatz kultiviert. (S. 519—526.)

2. Von der Keimpflanze wurden Wurzel, Spross und Mesokotyl (erstes Sprossglied) einzeln kultiviert:

Die Kultur der *Wurzeln* erfolgte in Kulturkolben oder in liegenden Reagenzgläsern, in denen die Schichthöhe der Kulturflüssigkeit 12 mm nicht übersteigen darf (Versorgung mit Sauerstoff). Die *Keimsprosse* wurden in Reagenzgläsern oder in längeren Kulturröhren kultiviert. *Mesokotylstücke* wurden in liegenden Reagenzgläsern oder in Erlenmeyerkölbchen kultiviert. (S. 527 bis 530.)

Das Längenwachstum von Maiswurzeln verläuft mindestens während der ersten vierzehn Tage (Temperatur ca. 20° C) in Organkultur gleichmässig. (Abbildung 8.)

Sproßstücke (Koleoptile + Blätter + Mesokotyl) von anfänglich 8 mm Länge wuchsen in Organkultur zu normalen Keimpflanzen mit Wurzeln, grünen Blättern und Blütenanlagen aus. (Abbildung 7.)

Solche endospermfrei gezogene Keimpflanzen können auch in Erde normal weiterwachsen.

3. Der Gehalt der Nährlösung an Glukose und Wuchsstoff wurde verändert und der verschiedene Einfluss auf das Wachstum der isolierten Teile der Keimpflanze studiert:

Ein Vergleich des Zuwachses von verschiedenen Maiswurzeln in Nährlösungen mit verschiedenem Glukosegehalt ergibt eine ausgesprochene Optimumkurve. Das Wachstumsoptimum liegt bei 3 %; selbst bei $^1/_{81}$ % Glukose zeigt sich stärkeres Wachstum als bei einer glukosefreien Versuchsserie; auch ohne Glukosegehalt der Nährlösung ist ein geringes Wachstum nachweisbar. (Abbildung 9, S. 532.)

Zugabe von Wuchsstoff bewirkt je nach seiner Konzentration eine Förderung oder Hemmung des *Längenwachstums der Wurzel*. Beispielsweise bewirkte Heteroauxin in einer molaren Konzentration von $2{,}86 \times 10^{-11}$ eine Förderung, bei $2{,}86 \times 10^{-5}$ molar eine Hemmung. (Abbildung 10, S. 533—536.)

Der Charakter der Wirkungskurve des Wuchsstoffes bleibt bei Verwendung verschiedener Zuckerkonzentrationen erhalten; zudem bleibt das Optimum der Wuchsstoffwirkung bei den gleichen Konzentrationswerten. (Abbildung 11, S. 535.)

Die Zugabe von Wuchsstoff bewirkt je nach der verwendeten Konzentration eine Förderung oder Hemmung des *Sprosswachstums;* die wirksamen Konzentrationswerte liegen 100—1000mal höher als bei Wurzelkulturen. (Abbildung 12, S. 537—538.)

Mesokotylstücke in Organkultur wurden als Testobjekt für die Feststellung der wurzel*bildenden* Eigenschaften des Wuchsstoffes verwendet. Bei vorübergehender Einwirkung (2—5 Tage) von Wuchsstoff treten nach anschliessender Kultur in wuchsstofffreier Nährlösung während etwa zwei Wochen *Wurzelanlagen* auf. (Abbildung 14, S. 533—541.)

Eine dreitägige Einwirkung von Wuchsstoff, verabreicht als $5{,}7 \times 10^{-5}$ molare Heteroauxinlösung, wirkte optimal auf die Neubildung von Adventivwurzeln. (Abbildung 14.)

* * *

Die vorliegende Arbeit wurde in den Jahren 1936—1939 im Botanischen Institut der Universität Basel unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Geiger-Huber ausgeführt; die Untersuchungen mussten wegen anderweitiger Inanspruchnahme für längere Zeit unterbrochen werden. Herrn Prof. Geiger-Huber danke ich herzlich für die mannigfachen Anregungen und für die tatkräftige Unterstützung während der Ausführung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. G. Senn, dem Vorsteher des Institutes, möchte ich ebenfalls den besten Dank aussprechen für das ständige wohlwollende Interesse und für die Ueberlassung der Mittel des Institutes.

Ebenso danke ich dem Verband landwirtschaftlicher Genossenschaften des Kantons St. Gallen für die zuvorkommende Bedienung mit erstklassigem Mais.

Leider wurde die Publikation der bereits im Juni 1939 druckfertigen Arbeit durch Militärdienstleistung des Verfassers seit Herbst 1939 stark verzögert.

Basel, Botanisches Institut der Universität.

Literaturverzeichnis.

1924 Benecke-Jost. Pflanzenphysiologie, I. Band. Jena.

1936 Boyd, L. and Avery, G. S. Grass seedling anatomy: the first internode of avena and triticum. Botanical Gazette **97**, 765—779.

1936 Burlet, E. Zur Methodik der pflanzlichen Organkultur. Verh. Schweiz. Naturf. Ges. Solothurn 1936, 312—313.

1938 — Die Keimpflanze von Zea Mays als Testobjekt für wurzelbildende Stoffe (vorl. Mitt.). Verh. Schweiz. Naturf. Ges. Chur 1938, 181.

1928 Geiger, Max. Beitrag zur Kenntnis der Physiologie keimender Samen. Jahrb. für wiss. Bot. **69**, 329—356.

1936 Geiger-Huber, M. Der Einfluss des Wuchshormons (Heteroauxin) auf das Wurzelwachstum (vorl. Mitt.). Verh. Schweiz. Naturf. Ges. Solothurn 1936, 313.

1936 — und Burlet, E. Ueber den hormonalen Einfluss der β-Indolylessigsäure auf das Wachstum isolierter Wurzeln in keimfreier Organkultur. Jahrb. f. wiss. Bot. 1936, **84**, 233—253.

1918 Heim, L. Lehrbuch der Bakteriologie, Stuttgart.

1928 Janke-Zikes. Arbeitsmethoden der Mikrobiologie, Dresden und Leipzig.
1921 Küster, E. Anleitung zur Kultur der Mikroorganismen, Leipzig.
1926 Kostytschew, Lehrbuch der Pflanzenphysiologie, Berlin.
1922 Kotte, W. Kulturversuche mit isolierten Wurzelspitzen. Beitr. allg. Bot. **2,** 413—434.
1901 Polowzow, W. Untersuchungen über Pflanzenatmung. Mém. Acad. imp. sc. de St-Pétersbourg, **12,** 1—69.
1922 Robbins, W. J. Cultivation of excised root tips and stem tips under steril conditions. Bot. Gaz. **73,** 367—390.
1934 Schander, H. Keimungsphysiologische Studien über die Bedeutung der Aleuronschicht bei Oryza und andern Gramineen. Zeitschr. f. Bot. **27,** 433—515.
1931 Went und Kostytschew. Lehrbuch der Pflanzenphysiologie **II,** Berlin.
1937 — and Thimann. Phytohormones, New York.
1932 White, Ph. R. Influence of some environmental conditions on the growth of excised root tips of wheat seedlings in liquid media. Plant Physiol., **7,** 613—628.

Curriculum vitae.

Ich, Ernst Hans Ludwig Burlet, von Reichenburg (Kt. Schwyz), wurde geboren zu Bern am 24. September 1912 als Sohn des Karl Alois Burlet, Elektroingenieur, und der Anna Maria Katharina geb. Wüscher. Als mein Vater im Jahre 1927 zum Vorsteher der Materialverwaltung der SBB gewählt wurde, übersiedelte die Familie nach Basel; hier besuchte ich die obere Realschule und das Mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium bis zu der im Frühjahr 1931 abgelegten Maturitätsprüfung. Seither studierte ich an der Universität Basel. 1935/36 absolvierte ich eine einjährige Praxis in der Aktienbrauerei Basel. Vom Sommer 1937 bis anfangs 1939 war ich Privatassistent von Herrn Professor Dr. M. Geiger-Huber.

Während meiner Studienzeit besuchte ich die Vorlesungen und Praktika der folgenden Herren Dozenten: Edlbacher, Fichter, Geiger-Huber, Geigy, Hagenbach, Handschin, Hediger, Leuthardt, Portmann, Rupe, Schüepp, Senn, Vischer, Wehrli.

Meine Dissertation verfasste ich unter der Leitung von Herrn Professor Dr. M. Geiger-Huber.

Allen meinen verehrten Lehrern spreche ich an dieser Stelle meinen besten Dank aus für die Förderung, die sie meinen Studien haben angedeihen lassen.